

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE NUTRICIÓN

**EFFECTO HEPATOPROTECTOR DE LA
ALMENDRA DE SEMILLAS DE *Cucurbita maxima*
(ZAPALLO MACRE) EN RATAS**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado En Nutrición

AUTOR

José Antonio Benjamín Caballero Calampa

ASESORES

Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

Dedico este gran esfuerzo a mis padres por su incondicional apoyo y confianza a lo largo de estos años, a mis hermanas por los buenos momentos que me brindan cada día al estar cada vez más juntos, a las personas grandiosas y valiosas que quienes sin su apoyo no podría haber alcanzado esta meta. Finalmente, dedicarle este trabajo a nuestra querida Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quien nos albergó durante 5 años y nos brindó todos los conocimientos que hoy tenemos y demostramos ante la sociedad, con el único objetivo de ayudar y colaborar en la mejora de nuestra comunidad.

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor:

Quisiera agradecer al Mg. Oscar Huamán por su constante apoyo y sus aportes para el desarrollo de este trabajo que ayudó a enriquecer y ampliar.

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición:

Por permitirme ejecutar la tesis.

Al Instituto de Patología de la UNMSM:

Agradecer al Dr. José Ernesto Ráez Gonzales por su gran aporte en la descripción de las láminas histológicas.

AGRADECIMIENTOS:

A mi Escuela:

Por la formación profesional que me dio.

A mis profesores:

Por ser verdaderos maestro.

A mis amigos:

A mis amigos y colegas de la universidad por el apoyo que siempre me brindaron y por los momentos inolvidables que hemos vivido a lo largo de los cinco años.

A los miembros del Jurado de Sustentación por la aprobación de la sustentación de la tesis.

RESUMEN

Objetivos: El presente estudio tiene por objetivo determinar el efecto hepatoprotector de la almendra de semilla de *Cucurbita máxima*, sobre los marcadores del daño hepático en ratas con intoxicación por paracetamol. **Materiales y métodos:** tipo de estudio analítico, experimental, transversal y prospectivo; se empleó 48 ratas Holtzman machos adultos de 2 meses de edad, con peso de 225 ± 24.7 g. Se utilizaron las almendras de semillas de *Cucurbita maxima* (zapallo macre), la almendra se obtuvo retirando el epispermo y la cutícula que rodea el endospermo de la semilla, obteniéndose la almendra del zapallo, el cual fue triturado en mortero y suspendido en agua destilada. Las ratas fueron distribuidas de forma aleatoria en seis grupos (n=8). Los cuales recibieron los siguientes tratamientos, por diez días, vía peroral: grupos I y II: suero fisiológico 10mL/kg; grupo III: silimarina 100mg/kg; grupo IV: 50mg/kg; grupo V: 300mg/kg y grupo VI: 800mg/kg de suspensión de almendra de semilla, *Cucurbita maxima*. Al sexto día de tratamiento los grupos del II al VI recibieron paracetamol a 400mg/kg vía peroral, con una hora de diferencia del tratamiento anterior, hasta completar los diez días. **Principales medidas de resultados:** En suero sanguíneo se determinó aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), proteínas totales, albúmina sérica, bilirrubina directa, indirecta y total; y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), este último también se evaluó en el homogenizado de hígado. Además, se realizó el estudio histopatológico del hígado para identificar signos de necrosis y signos de regeneración. **Resultados:** la suspensión de la almendra de semilla de *Cucurbita maxima* (zapallo macre) ejerce un efecto hepatoprotector, esto se evidencia en los indicadores enzimáticos (ALT y AST), albúmina, proteínas totales y TBARS en hígado. Histopatológicamente, se observó signos de necrosis con la administración solo de paracetamol y en el grupo tratado además con la suspensión de semillas se mostró una restauración de las lesiones histopatológicas inducidas por paracetamol. **Conclusiones:** La almendra de semilla de *Cucurbita maxima* (zapallo macre) ejerce un efecto hepatoprotector.

Palabras clave: Planta medicinal, zapallo macre, semillas, paracetamol, hepatoprotector.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
2.1. HIPÓTESIS	19
2.2. OBJETIVOS	19
III. METODOLOGÍA	20
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	20
3.2. MATERIALES	20
3.3. VARIABLES	21
3.4. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO:	23
3.5. CONDICIONAMIENTO DE LA UNIDAD DE ANÁLISIS	23
3.6. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE LA ALMENDRA.....	23
3.7. INDUCCIÓN A LA HEPATOTOXICIDAD:	24
3.8. DISEÑO ESTADÍSTICO	32
IV. RESULTADOS.....	33
V. DISCUSIÓN.....	39
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
6.1. CONCLUSIONES	46
6.2. RECOMENDACIONES.....	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas crónicas producen elevados costos al sistema sanitario, que van aumentando a medida que la hepatopatía va avanzando, esto unido al hecho de que las enfermedades del hígado constituyen un problema creciente en todo el mundo. En el Perú estas enfermedades ocupan el 5^{to} lugar entre las causas de mortalidad y el 2^{do} lugar entre las enfermedades digestivas y hepatobiliares, entonces la importancia del uso de tratamientos eficaces, que mejoren la salud de los pacientes y, en consecuencia, reduzcan los costos directos e indirectos relacionados con estas enfermedades, asimismo, resaltar la necesidad de que las autoridades sanitarias inviertan más recursos en acciones preventivas, siendo de suma importancia la prevención con la finalidad de proporcionar a la población una mejor calidad de vida ⁽¹⁾.

Las hepatopatías pueden ser causadas por distintos agentes: fármacos, tóxicos, virus, dando similar sintomatología. Las enfermedades hepáticas en el Perú constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad, siendo la Hepatitis Viral de alta endemicidad en muchas regiones del país y la cirrosis hepática la causa más frecuente de presentación crónica asociada a mortalidad, la cirrosis hepática ocupa el 5° lugar, en orden de magnitud entre las defunciones generales, el 2° lugar entre las enfermedades digestivas y hepatobiliares y es la 2° causa de muerte entre las defunciones registradas ⁽²⁾.

El hígado es el segundo órgano más grande del cuerpo, después de la piel, y es el mayor órgano interno, el cual tiene un papel vital para el organismo humano, presentando multiplicidad funcional metabólica, digestiva, hemostática, inmunológica y de reserva, con flujo de alrededor de 1500 mL de sangre por minuto. Cada uno de los dos lóbulos principales contiene unidades más pequeñas llamadas lobulillos. La mayoría de los hígados tienen de 50 000 a 100 000 lobulillos que constan de una vena rodeada por minúsculas células hepáticas llamadas hepatocitos. Estas células purifican

la sangre, eliminan los desechos, toxinas y almacenan nutrientes para que el cuerpo los utilice cuando sea necesario ⁽³⁾.

El hígado desempeña un papel esencial para la mayoría de las funciones metabólicas del organismo y efectúa más de 500 tareas, entre sus funciones está la de filtrar sangre, metabolizar los carbohidratos, proteínas, hormonas, bilis, vitaminas y almacenar hierro, producir factores de coagulación ⁽⁴⁾ ; pero también es un órgano que se ve afectado por numerosos procesos inflamatorios como infecciones víricas, toxicidad por fármacos y sus metabolitos, procesos autoinmunes y distintos defectos genéticos ⁽³⁾.

El metabolismo de los fármacos en el hígado se produce fundamentalmente en dos fases. Las reacciones de fase I que consisten en reacciones de oxidación y reducción que modifican o crean nuevos grupos funcionales, así como reacciones de hidrólisis que rompen los enlaces ésteres y amidas, liberando también nuevos grupos funcionales. Estos cambios se siguen de un aumento de la hidrosolubilidad de los metabolitos, lo cual facilita su excreción biliar y urinaria ⁽⁵⁾. Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación en las que el fármaco o un metabolito derivado del mismo se acoplan con substratos endógenos como el ácido glucurónico, acético, sulfúrico o glutatión (GSH), generando metabolitos más solubles en medios hídricos facilitando de esta forma su excreción. El resultado de éste proceso es la generación intracelular de radicales libres o compuestos electrofílicos que deplecionan el glutatión de las células, se unen covalentemente a proteínas, lípidos, ácidos nucleicos o inducen peroxidación lipídica ⁽⁵⁾.

La lesión citotóxica culmina en la muerte celular por necrosis o apoptosis. La necrosis es consecuencia directa de la peroxidación de los lípidos de membrana, dando lugar a la rotura celular y a la salida de componentes citosólicos al espacio extracelular. La apoptosis en cambio se caracteriza por la condensación progresiva de la cromatina nuclear, descrita sobre todo en relación con la toxicidad por ácido biliar y mediado por un mecanismo dependiente de Fas (proteína receptora de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral alfa). El exceso de ácidos biliares en el citosol

hepático ocasiona una traslocación del Fas citosólico a la membrana, uniéndose a su ligando fisiológico (FasL) ⁽⁶⁾.

El daño hepatocelular causa que disminuya la capacidad del hígado para conjuguar la bilirrubina, alterando así su excreción y provocando un aumento de la bilirrubina total. Los niveles de bilirrubina se elevan cuando el hígado pierde al menos el 50% de su capacidad de excreción; por lo tanto, la presencia de hiperbilirrubinemia conjugada (bilirrubina directa) habitualmente es un signo de enfermedad hepática. La alteración, en combinación con aumento marcado de las transaminasas (ALT, AST), puede sugerir hepatitis viral aguda o lesión hepática isquémica o tóxica; el patrón también puede ser la forma de presentación de la hepatitis autoinmune ⁽⁷⁾.

Algunas pocas pruebas hepáticas miden funciones fisiológicas identificables, como ocurre con la bilirrubina, la albúmina y el tiempo de protrombina, mientras la mayoría no mide una función específica sino que indica la presencia de daño y la falta de permeabilidad de las vías biliares. Entre estas pruebas están las aminotrasferasas, la gammaglutamil transferasa y la fosfatasa alcalina; por ultimo están las pruebas que evalúan la reacción al daño hepático, como las globulinas o los anticuerpos tisulares, las populares que apuntan a una etiología específica, como son los marcadores de infección viral ^(8,9).

Las pruebas de función hepática no deben interpretarse como resultados anormales aislados, sino utilizando paneles con patrones característicos que permitan identificar o aproximarnos al diagnóstico de las enfermedades hepáticas, esto debido a que las pruebas pueden ser anormales en muchos procesos que no son precisamente de origen hepático, como por ejemplo la sepsis, el infarto agudo de miocardio, las infecciones como la brucelosis y la endocarditis bacteriana subaguda, entre otros. Suelen utilizarse distintas pruebas para examinar las diferentes funciones del hígado; como la presencia de bilirrubina ya que esta es el principal metabolito del grupo hemo de la hemoglobina, mioglobina y los citocromos. Diariamente se

producen alrededor de 250mg a 350mg de bilirrubina, 85% como resultado de la destrucción de los eritrocitos viejos ^(8,9).

La mayoría de la bilirrubina se transporta unida a la albúmina (directa o conjugada) y solo una pequeña fracción circular libre (indirecta o no conjugada). El aumento de la bilirrubina total junto con el aumento de la bilirrubina directa, se presenta cuando hay necrosis y colestasis ⁽⁸⁾.

La albúmina, es la principal proteína producida por el hígado; sin embargo, no solo se altera cuando hay daño hepático, sino cuando hay pérdida de proteínas, estados catabólicos y desnutrición, una disminución de la albúmina sérica se observa cuando hay destrucción masiva del tejido hepático y es uno de los principales factores pronósticos de la cirrosis ^(8,9).

Concentraciones séricas de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST); son los indicadores más comúnmente utilizados y con mayor sensibilidad para evaluar la presencia de necrosis hepática. Se encuentran en altas concentraciones en las células hepáticas, donde catalizan la transferencia de grupos aminos para producir ácido pirúvico y oxalacético, respectivamente, utilizando vitamina B6 como cofactor. Cuando se presenta daño en la membrana celular del hepatocito, estas enzimas que se encuentran en el citoplasma, pasan al plasma, aumentando su actividad en circulación, siendo la ALT más específica que la AST, ya que esta no solo se encuentra en el hígado sino también en el músculo esquelético y cardíaco, en el riñón y en los eritrocitos ⁽⁸⁾.

La gamma glutamil transferasa (GGT) regula el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares al catalizar la transferencia de un grupo glutamil a los aminoácidos libres. Su medición concomitante con la fosfatasa alcalina, ya que la GGT proviene casi exclusivamente del hígado, así; unos valores elevados de fosfatasa alcalina acompañados de unos valores elevados de GGT se asocian con una enfermedad de tracto biliar. La fosfatasa alcalina se encuentra presente en varios tejidos, incluyendo el hígado, el hueso, el riñón, el intestino y la placenta, esta enzima en el hígado se encuentra en la superficie canalicular y por tanto es un marcador

de disfunción biliar, cuyos valores se pueden aumentar hasta 10 veces en obstrucciones biliares, en procesos infecciosos o en presencia de masas ⁽⁸⁾.

Otras pruebas utilizadas en el diagnóstico de las hepatopatías comprenden los estudios ecográficos, la biopsias mediante trocar con estudios histológicos del tejido y la laparoscopia ⁽¹⁰⁾.

La hepatotoxicidad se define como la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos. Con el término reacción medicamentosa adversa se designa a la aparición de efectos deletéreos no intencionales que se producen con dosis farmacológicas utilizadas con fines profilácticos y terapéuticos. Estas reacciones adversas que afectan al hígado se detectan por medio de las siguientes alteraciones de los análisis bioquímicos hepáticos: 1) aumento de alanino aminotransferasa (ALT) superior a dos veces el límite alto de la normalidad, 2) aumento de la concentración de bilirrubina directa sérica más de dos veces el límite alto de la normalidad, 3) aumento de aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y la concentración total de bilirrubina, siempre que uno de ellos supere más de dos veces el límite alto de la normalidad ⁽¹¹⁾.

Existen dos tipos de hepatotoxicidad: intrínseca e idiosincrásica. La hepatotoxicidad intrínseca, o dosis dependiente, es predecible y reproducible, ocurre con una minoría de fármacos, mientras algunas de estas hepatotoxinas actúan directamente sobre el hepatocito, otras lo hacen a través de un compuesto tóxico generado durante su metabolismo cuyo ejemplo más característico es el paracetamol. Otros ejemplos de hepatotoxicidad intrínseca son los producidos por el ácido acetilsalicílico, intoxicación por setas (*Amanita phalloides*) y las alteraciones hepáticas producidas por productos industriales como el tetracloruro de carbono. La hepatotoxicidad idiosincrásica, en cambio, ocurre de modo impredecible, no se relaciona con la dosis y no es reproducible en animales de experimentación. Esta última a su vez se divide en idiosincrasia metabólica e inmunoalérgica ⁽¹²⁾.

Las enfermedades hepáticas son comunes y muchas veces silenciosas, y son una causa importante de muerte en el mundo. Las principales entidades asociadas al daño hepático incluyen las enfermedades virales, la esteatohepatitis no alcohólica, el exceso de alcohol, entre otras.

El paracetamol o acetaminofén es una droga analgésica-antipirética que se comercializa libremente sin necesidad de prescripción médica y es uno de los medicamentos más usados en niños. Este fármaco posee propiedades analgésicas y antipiréticas similares a las de la aspirina. Sin embargo, no tiene actividad antiinflamatoria periférica ni afecta la función plaquetaria, es decir a diferencia de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) presenta una acción antiinflamatoria débil, inhibe pobremente a la ciclooxigenasa 2 (COX-2), principalmente en el sistema nervioso central y no interactúa en la activación de los neutrófilos, en los alcohólicos crónicos presentan especial riesgo, ya que pueden verse afectados incluso tomando las dosis recomendadas ^(13,14).

La popularidad del paracetamol como antipirético, analgésico seguro y eficaz ha aumentado en el último tiempo, su uso ha subido rápidamente y el incremento en la disponibilidad lo ha transformado en uno de los agentes más comunes en las sobredosis accidentales como intencionales, los efectos de la toxicidad por paracetamol radican en la lesión del hígado ⁽¹⁵⁾.

Cuando el paracetamol es administrado, el 95% es metabolizado en el hígado y el resto se excretan inalterada por la orina, de la fracción metabolizada por el hígado, el 90% sufre conjugación con ácido glucurónico o sulfatos y el resto es metabolizado por el citocromo P-450 en un metabolito tóxico: N-acetil-p benzoquinoneimina (NAPQI), este metabolito es rápidamente detoxificado gracias a la conjugación con glutatión (GSH) ⁽¹⁶⁾.

Cuando los depósitos de glutatión están disminuidos un 70% o más, o cuando existe una sobredosificación de paracetamol, las reservas de glutatión se agotan, entonces la NAPQI no podrá ser conjugada totalmente, produciéndose un enlace covalente entre el tóxico y la bicapa lipídica del

hepatocito, o entre el tóxico y las proteínas de la célula, que aromatiza a los elementos donadores de electrones, produciendo necrosis centrolobulillar, también puede presentarse necrosis tubular renal y coma hipoglucémico.^(14,17) En estos casos de déficit, el glutatión puede ser reemplazado por grupos sulfhidrilos procedentes de la dieta o de fármacos como la N-acetilcisteína⁽¹⁷⁾.

Además el paracetamol también es peroxidado por la mieloperoxidasa y la COX, produciendo también metabolitos hepatotóxicos y provocando daño hepático en pacientes con insuficiencia renal crónica y asma, en particular por la supuesta seguridad del paracetamol en estas enfermedades⁽¹⁷⁾.

Los radicales libres son generados por células animales en ciertas circunstancias especiales. Algunas enzimas utilizan un radical libre en su sitio activo en el proceso de catálisis. Los fagocitos activados también generan superóxido como parte de su papel bactericida, estas sustancias también es producida por otros mecanismos, entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo); aproximadamente 2 a 3% del oxígeno consumido por una célula es convertido en radicales libres⁽¹⁸⁾, al interactuar con las principales biomoléculas del organismo, igualmente se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida; por último no se puede olvidar agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el shock térmico⁽¹⁹⁾.

En la naturaleza casi todo es oxidado por el oxígeno: las grasas se vuelven rancias, la goma pierde elasticidad, el papel amarillea, etc. Además estas reacciones de óxido-reducción son muy importantes en la bioquímica de los seres vivos, puesto que obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas: en la fotosíntesis la energía solar impulsa la reducción del CO₂ y la oxidación del H₂O formando carbohidratos y O₂ y en el metabolismo aeróbico, realizado por los eucariotas y muchos procariotas, tiene lugar un proceso inverso a la fotosíntesis, que permite almacenar la energía libre

producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP ⁽²⁰⁾.

Pero este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las biomoléculas (proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.). De los ROS inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O₂, el radical-anión superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (HO•) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO•), el hidroperóxido orgánico (ROOH) y los lípidos peroxidados ⁽²¹⁾.

Dichas reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Los cuales involucran la transferencia de electrones que producen radicales libres. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que los neutralicen. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre ^(21,22).

El antioxidante al reaccionar con los radicales libres, le cede un electrón, oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los radicales libres. De lo dicho anteriormente se deduce que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no, estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta) ⁽²³⁾.

Dentro de los antioxidantes es importante destacar a ciertos oligoelementos cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del núcleo

activo de las enzimas antioxidantes. Estos oligoelementos son: cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro ⁽²³⁾.

En la actualidad, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente gracias a la investigación constante en ciertas áreas de interés. Las prioridades ya no solo se encuentran centradas en las carencias nutricionales sino que actualmente el interés radica en la relación entre alimentación y la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades, esto por medio de la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos ⁽²⁴⁾.

En los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio científico de los efectos de la alimentación en los procesos oxidativos que los ROS producen en el ADN, proteínas y lípidos, ya que los productos de estos juega un papel muy importante en el envejecimiento y en una amplia gama de enfermedades comunes, incluyendo el cáncer y enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, neurodegenerativas y hepáticas ⁽²⁵⁾.

Los alimentos funcionales son alimentos en los que algunos de sus componentes afectan las funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede ser: contribuir a la mantención de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas cosas ⁽²⁶⁾.

El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80 con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional ⁽²⁷⁾.

Según la The Internacional Life Science Institute (ILSI) establece que se puede considerar que un alimento es funcional si logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto benéfico sobre una o varias

funciones específicas en el organismo, que mejora el estado de salud y bienestar, o bien que reduce el riesgo de una enfermedad ⁽²⁸⁾.

Para ser considerados alimento funcional o “FOSHU”, se requieren pruebas de que el producto alimenticio final, y no sus componentes individuales aislados, probablemente ejerza un efecto saludable sobre el organismo cuando se lo consume como parte de una dieta corriente. Los productos FOSHU deben presentarse en forma de alimentos habituales y no como comprimidos o cápsulas ⁽²⁹⁾.

El documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales en Europa elaborado por un comité de expertos de la Functional Food Science Europe (FUFOSE) bajo el liderazgo del ILSI Europe en 1998 ⁽²⁸⁾ como publica ILSI europe menciona que el alimento funcional será similar en apariencia a un alimento convencional o puede ser un alimento convencional, que sea consumido como parte de una dieta usual, y que se haya demostrado que tenga beneficios fisiológicos y/o que reduzca el riesgo de enfermedades crónicas más allá de sus funciones nutricionales básicas ⁽³⁰⁾.

El concepto de Alimentos Funcionales surge como un instrumento para mejorar la salud de la población y reducir el riesgo de ciertas enfermedades, a partir de la mayor esperanza de vida y del crecimiento de las enfermedades y sus consecuencias sobre la salud pública. Es importante resaltar que un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y ejercer sus acciones benéficas en las cantidades habitualmente consumidas en la dieta ⁽³¹⁾.

Estudios epidemiológicos demuestran que un mayor consumo de frutas y hortalizas reduce el riesgo de padecer enfermedades crónicas o degenerativas (cardiovasculares, diabetes, cáncer, obesidad). El consumo de hortalizas ricas en carotenoides, reduce la incidencia de ciertos tipos de cáncer ⁽³¹⁾.

Gema en 1999 empleo flavonoide como hepatoprotector frente al tetracloruro de carbono, el cual genera radicales libres, siendo uno de los

principales efectos de los flavonoides el de neutralizar la generación de estos radicales, en este estudio se encontró que el porcentaje de protección calculado para el flavonoide fue de 94% ⁽³²⁾.

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de plantas y/o alimentos con propiedades medicinales, con la finalidad de demostrar que ciertos componentes (fitonutrientes) poseen un efecto beneficioso sobre el organismo, como es el caso de la Corteza del árbol de Borotutu, Raíz de Achicoria, yacon, *Cardo Mariano*, etc., todos estos con propiedades “destoxificantes del hígado”, en realidad, el contenido de fitonutrientes de estas plantas ayudan a proteger el cuerpo de las toxinas de nuestro alrededor como la polución, alcohol, estrés general, radiación, químicos tóxicos en nuestra agua, aire y productos, es decir, proveen mecanismos, entre ellos los antioxidantes, para combatir la generación de radicales libres, que ayudan a reducir la inflamación del hígado, favoreciendo la eliminación de toxinas del hígado y a la reducción de las posibilidades del daño ⁽³³⁾.

En un trabajo realizado por Luzmila Troncoso y col. en el 2007, se pudo observar que el extracto de perejil ejerce un efecto antioxidante y hepatoprotector efectivo en ratas con intoxicación inducida por paracetamol (200 mg/kg) evidenciado en la ALT, GGT, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) y observaciones histopatológicas ⁽³⁴⁾. En otro estudio se pudo comprobar el efecto hepatoprotector del extracto acuoso del boldo (*Peumus boldus*) frente al daño hepático por acetaminofén (200mg/kg) a través de las transaminasas (ALT) ⁽³⁵⁾.

En un estudio realizado por Martínez Aguilar y col. en el año 2011, se determinó el perfil de fitoesteroles en semillas de cinco variedades de *Cucurbitas*, los cuales presentaron una concentración superior al aceite de soya, aceite de oliva, maíz y trigo, mostrando que hay mayores concentraciones de beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol y estigmastenol ⁽³⁶⁾.

En un análisis realizado a las semillas de *Cucurbita moschata* se pudo observar que estas presentan hasta un 43% de aceite, con ácidos grasos saturados oscilando entre 37,5 a 51% y los insaturados entre 48,8 y 62,4%, y dentro de éste último, el ácido linoleico puede llegar a 62,41%. En menor proporción el ácido palmítico (25,11%), esteárico (10,79%), araquídico (0,53-0,78%) y linolénico (0,66%) ⁽³⁷⁾.

En otro estudio se evaluó cuatro variedades de semillas de cucúrbitas donde el ácido graso predominante fue el ácido linoleico, variando entre 37,84 a 52,59%, el palmítico, el esteárico y el n9- oleico variaron entre 13,04 a 15,30%, 6,49 a 9,81% y 27,16 a 38,30% respectivamente. El ácido araquídico fue significativamente inferior al 1% en todas las variedades analizadas (0,53 a 0,78%), concluyendo que estas semillas en general tienen altos niveles de aceites, los que presentan óptimas propiedades organolépticas de aceite comestible, físicamente estable y sin signos de mostrar rancidez, considerándolos como buena fuente de aceites vegetales ⁽³⁸⁾.

El zapallo es una de las numerosas especies que integran la gran familia de las Cucurbitáceas, representada por cerca 120 géneros y 800 especies. Todas ellas son muy sensibles al frío. Se originaron en las zonas tropicales y subtropicales del mundo y la mayoría han desarrollado largas guías o ramas con zarcillos para adaptarse a la competencia por la luz. Tanto las especies nativas como las cultivadas poseen plantas anuales o perennes, generalmente cultivadas en climas templados. Son prolíficas en producción de semillas, dado que viven una temporada hasta que mueren por las heladas ⁽³⁹⁾.

Muchas otras lenguas nativas se aplican a los diferentes miembros de esta gran familia como: “calabaza”, “zapallo”, “zapallito”, “melón”, “sandía”, “pepino”, etc. De éstos, los de calabaza y zapallo son los más difundidos, casi siempre referidos a las especies de *Cucurbita*. “Calabaza” se utiliza para describir los frutos de cáscara dura de las cucurbitáceas que generalmente se refieren a la “calabaza de botella” o “mate” (*Lagenaria*

siceraria), o una especie silvestre de *Cucurbita* o una forma ornamental de *C. pepo* ⁽³⁹⁾.

El género *Cucurbita* es nativo del continente americano. Incluye cerca de 27 especies que pueden ser anuales o perennes y son cultivadas principalmente para el consumo de sus frutos al estado maduro o inmaduro. Pero también se consumen otras partes de la planta como las hojas, las flores y las semillas de los frutos. Los nombres comunes más difundidos en la lengua española son los de zapallo o calabaza ⁽⁴⁰⁾.

El hombre ha domesticado cinco especies para el consumo de sus frutos: *Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma* ex mixta con plantas anuales, y *C. ficifolia*, con plantas perennes ⁽⁴⁰⁾.

El fruto de las Cucurbitáceas es uno de los más grandes del reino vegetal. Es indehiscente, con el pericarpo carnosos adherido al pericarpio, y se lo clasifica como una baya ínfera. Las variedades de zapallo criollo y de Angola son numerosas, y la lista aumenta constantemente debido a la hibridación y la selección artificial, de modo que los caracteres del fruto presentan amplias variaciones especialmente en cuanto a forma, tamaño, consistencia de la corteza y color. Las variedades de *C. maxima*, cuyo fruto es groseramente elíptico, terminando en pedúnculo encorvado. La corteza puede ser blanca, verde, amarilla, roja o irregularmente manchada o con manchas dispuestas en bandas.

Las semillas son grandes, chatas, ovadas, y una de las extremidades termina en punta. El peso aproximado es de 50 mg para las cultivares de frutos pequeños y de 250 mg para las de frutos más grandes. Las semillas maduras no contienen endospermas funcionales. El embrión llena por completo la cubierta de la semilla y las reservas se almacenan en los cotiledones en forma de lípidos, en pequeños cuerpos esféricos denominados esferosomas, y de proteínas, en orgánulos de proteínas. En el fruto, los componentes predominantes del mesocarpio son carbohidratos, mientras que en las semillas predominan lípidos y proteínas, que aportan hasta el 80-85% del peso seco del embrión ⁽⁴¹⁾.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La administración de la almendra de semilla de *Cucurbita maxima*, tiene actividad hepatoprotectora frente al paracetamol a dosis tóxica en ratas.

2.2. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto hepatoprotector de la almendra de semilla de *Cucurbita maxima* en ratas sometidas a un cuadro de toxicidad por paracetamol.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la almendra de *Cucurbita maxima* sobre la morfología del tejido hepático.
- Determinar el efecto de la almendra de *Cucurbita maxima* sobre los marcadores enzimáticos-proteicos del daño hepático.
- Determinar el efecto de la almendra de *Cucurbita maxima* sobre los marcadores no proteicos del daño hepático.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Según la finalidad: Analítico

Por la secuencia de estudio: transversal

Por el control de los factores de estudio: prospectivo.

3.2. Materiales

Material biológico

Ratas variedad Holtzman

Semilla de *Cucurbita maxima* (zapallo macre)

Materiales de vidrio y plástico

Embudos	Tubos de ensayo
---------	-----------------

Beaker	Matraz aforado
--------	----------------

Tips para micropipetas	Pizeta
------------------------	--------

Micropipetas	Bagueta
--------------	---------

Gradillas	Guantes
-----------	---------

Placas de Vidrio	Pipetas
------------------	---------

Equipos

Homogenizador marca: Ultra–Turrax; modelo: IKA-T10BASIC

Centrífuga marca: GREETMED; modelo: GTT119-300

Espectrofotómetro marca: GREETMED; modelo: NV203

Balanza analítica modelo: RADWG®; modelo: WTB200

Baño María marca: AVALIER; modelo: VL-32

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	CATEGORÍA DE
----------	-------------	-------------	--------------

Estufa marca: Unic` s[®]

Reactivos y fármacos

Metanol (SPECTRUM[®])

EDTA (Titriplex[®])

Ácido tiobarbitúrico

Tricloroacético (Scharlaw)

Éter (Merck KGaA)

Paracetamol (SIGMA-ALDRICH)

3.3. Variables

Variable independiente:

Almendra de la semilla de *Cucubita maxima* (zapallo macre):

Conformado por el endospermo y el embrión de la semilla de *Cucubita maxima*, exenta de la cutícula de esta y el epispermo de la semilla ⁽³⁸⁾.

Variable dependiente:

Efecto Hepatoprotector: Es la protección del hígado frente a la variación de la defensas antirradicalarios del organismo por efectos nocivos de xenobioticos ^(42, 43, 44).

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	CATEGORÍA Y PUNTOS DE CORTE	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable independiente: Almendra de la semilla de <i>Cucurbita maxima</i> (zapallo macre): Conformado por el endospermo y el embrión de la semilla de <i>Cucurbita maxima</i> , exenta de la cutícula de esta y el epispermo de la semilla (38).		Administración de la suspensión de la almendra de la semilla de cucurbita máxima.	<ul style="list-style-type: none">• Grupo controles: Grupo I: 10mL/kg Grupo II: 10mL/kg• Grupo estándar: Grupo III: 100mg/kg• Grupo experimental: Grupo IV: 50mg/kg Grupo V: 300mg/kg Grupo VI: 800mg/kg	Razón
Variable dependiente: Efecto Hepatoprotector: Es la protección del hígado frente a la variación de la defensas antirradicalarios del organismo por efectos nocivos de xenobioticos (42, 43, 44).	Morfología del tejido hepático	<ul style="list-style-type: none">• Índice hepático• Histológico	Comparados con los grupos controles (grupo I y grupo II)	Razón Cualitativa
	Marcadores bioquímicos enzimáticos-proteicos	<ul style="list-style-type: none">• Niveles en sangre de: AST, ALT, albúmina, proteínas totales.		Razón
	Marcadores bioquímico no enzimático-proteico	<ul style="list-style-type: none">• Niveles de TBARS en tejido hepático y suero.• Bilirrubina directa e indirecta y total.		Razón

3.3.1. Las variables a controlar

Se consideró la edad, género, peso, alimentación, temperatura, luz y aspectos generales de los animales de experimentación.

3.3.2. Prueba piloto

Para este proyecto se realizó una prueba piloto, para identificar y eliminar los posibles problemas en la administración y la concentración y dosis de la suspensión de las almendras de semilla de *Cucurbita maxima*, así como la dosis del paracetamol.

3.4. Recolección de la muestra de ensayo

La muestra se recolectó en el mercado de Mayorista de la Parada del distrito de La Victoria, Lima, Diciembre del 2013.

3.5. Condicionamiento de la unidad de análisis

Se utilizaron 48 ratas albinas, raza Holtzman, machos adultos de 2 meses de edad. Con un peso promedio de $225 \pm 24,7\text{g}$ los cuales fueron distribuidos de manera aleatoria en seis grupos ($n=8$) en jaulas de metal, en un ambiente controlado de 22°C de temperatura, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los grupos recibieron la misma dieta balanceada y agua *ad libitum*, durante el tratamiento. Antes de recibir los diferentes tratamientos las ratas tuvieron 7 días de acondicionamiento.

3.6. Preparación de la suspensión de la almendra

La suspensión de la almendra se obtuvo retirando el epispermo y la cutícula que rodea el endospermo de la semilla, obteniéndose la almendra del zapallo; la almendra de la semilla de *Cucurbita maxima* (zapallo variedad macre) fue triturada en mortero de porcelana y almacenada en botella de color caramelo a temperatura de 5°C , hasta el momento de su uso.

Las muestras fueron suspendidas con agua destilada para obtener las siguientes dosis: 50 mg/kg; 300 mg/kg y 800 mg/kg.

3.7. Inducción a la hepatotoxicidad:

Se empleó la técnica de inducción a hepatotoxicidad por paracetamol propuesta por Gibson y col.1996 ⁽⁴⁵⁾.

Los grupos recibieron el siguiente tratamiento por 10 días:

GRUPO	DESCRIPCIÓN	ADMINISTRACIÓN
		Vía per-oral
I	Control negativo	Suero fisiológico 10 mL/kg
II	Control positivo	Suero fisiológico 10 mL/kg
III	Estándar	Silimarina 100mg/kg
IV	Experimental 1	Suspensión 50mg/kg
V	Experimental 2	Suspensión 300mg/kg
VI	Experimental 3	Suspensión 800mg/kg

Al sexto día recibieron paracetamol a la dosis de 400mg/kg (excepto el grupo I) hasta el final del ensayo (día 10).

Concluido el tratamiento las ratas fueron sometidas a 12 horas de ayuno previo al sacrificio, las cuales se les anestesió por inhalación con vapores de éter dietílico en una campana de vidrio, la sangre se extrajo por punción cardiaca, para su posterior análisis de los marcadores enzimáticos y no enzimáticos del daño hepático, se realizó la laparotomía abdominal para extraer el hígado el cual será lavado con suero fisiológico y pesado en balanza analítica, posteriormente se identificó y separó el lóbulo mayor el cual se le secciono una porción de 500mg aproximadamente y el resto fue conservado en solución tamponada de formol al 10% para el estudio histológico, todo el proceso se realizó a una temperatura no mayor a 4°C.

La sangre se centrifugo a 1500 rpm en una centrifugadora clínica durante 20 minutos y se separó el suero para determinar los indicadores bioquímicos:

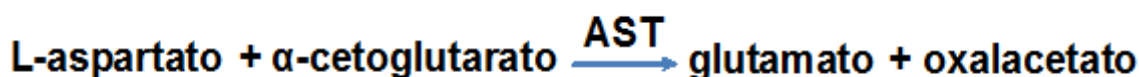
- Aspartato aminotrasferasa (AST) según Raitman S y Frankel ⁽⁴⁶⁾
- Alanina Aminotrasferasa (ALT) Según Raitman S y Frankel ⁽⁴⁶⁾

- Albumina sérica con el método de Verde de Bromo Cresol ⁽⁴⁷⁾
- Proteínas totales con el método de Biuret ⁽⁴⁷⁾
- Especies reactivas al ácido tiobarbiturico según Buege J. Aust S. ⁽⁴⁸⁾
- Bilirrubina directa e indirecta según Watson D. ⁽⁴⁹⁾

3.7.1. Determinación de la actividad de la Aspartato aminotransferasa (AST) según Raitman S y Frankel ⁽⁴⁶⁾

Esta enzima está presente en las células parenquimatosas del hígado, corazón y músculo. Su ubicación subcelular corresponde al citoplasma y la mitocondria. La elevación de la actividad sérica de la AST generalmente se acompaña de otras alteraciones y refleja necrosis hepatocelular.

Las transaminasas son aminotransferasas que cataliza la siguiente reacción:



Fundamento: El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

Reactivos:

Reactivo A (AST): L-aspartato 100 mmol/L y α -cetoglutarato 2 mmol/L en buffer fosfatos 100 mmol/L, pH 7,4.

Reactivo B: solución de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) 1 mmol en $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1 mol/L.

Reactivo C: solución de NaOH 0,4 N.

Protocolo: se empleó el siguiente protocolo:

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL de reactivo A baño maría a 37°C por 5 minutos, luego se agregó 100µL de suero a la misma temperatura por 30 minutos exactamente; luego se agregó 0,5 mL de reactivo B reposándolo en baño María por 10 minutos, concluido el tiempo se agregó 5 mL del reactivo C, se retiró inmediatamente y se mezcló por inversión.

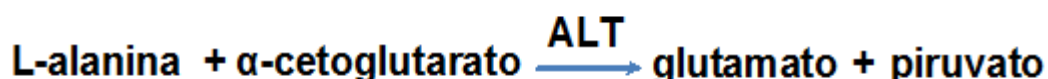
Después de 2 minutos se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero D.O. con agua destilada.

Se preparó una curva correspondiente (Anexo N°1) y un blanco reactivo (sin suero).

3.7.2. Determinación de la actividad de la Alanina Aminotrasferasa (ALT) Según Raitman S y Frankel ⁽⁴⁶⁾

Esta enzima es considerada una enzima hígado-específica aunque también están presentes en el riñón y, en cantidades muchos menores, en el miocardio y en el músculo esquelético.

Fundamento: La determinación de ALT se basa en el acoplamiento de la reacción de transferencia del grupo amino que cataliza la propia enzima con una reacción que consume NADH.



Reactivos:

Reactivo A (ALT): solución de L-alanina 200 mmol/L y α -cetoglutarato 2 mmol/L de en buffer fosfatos 100 mmol/L, pH 7,4.

Reactivo B: solución de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) 1 mmol/ en $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1 mol/L.

Reactivo C: solución de NaOH 0,4 N.

Protocolo: se empleó el siguiente protocolo:

Se vertió 0,5 mL del reactivo A en un tubo de ensayo y se colocó en baño María a 37°C por 5 minutos, luego se agregó 100 µL de suero y se agitó suavemente e incubó a la misma temperatura por 30 minutos exactamente; posteriormente se le agrega 0,5 mL de reactivo B dejándolo en baño María por 10 minutos a 37°C.

Concluido el tiempo se agregó 5 mL del reactivo C, se retiró inmediatamente, luego se mezcló por inversión

Después de 2 minutos se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero D.O. con agua destilada.

Se preparó una curva correspondiente (Anexo N°2) y un blanco reactivo (sin suero).

3.7.3. Albumina sérica según el método de Bromo Cresol ⁽⁴⁷⁾

La albúmina es una proteína producida por el hígado, este tipo de examen en suero mide la cantidad de esta proteína en la parte líquida y transparente de la sangre y ayuda a reconocer una enfermedad hepática o una enfermedad renal o si el cuerpo no está absorbiendo suficiente proteína.

Fundamento: La albúmina reacciona específicamente con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCG). El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del Blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.

Reactivo: solución de BCG 0,3 mmol/L, buffer acetato 0,1 mol/L y polioxietilén lauril éter 0,9 g/L.

Protocolo: Se empleó el siguiente protocolo:

En un tubo se agregó 2,5 mL de reactivo BCG a temperatura ambiente (15°-18°C), luego se agregó 10 µL y se homogenizó.

Se preparó un estándar con una solución de albúmina de 3 g/dL y un blanco reactivo (sin suero).

Luego los tubos fueron leídos dentro de los 5 minutos en el espectrofotómetro a 625 nm, llevando a cero con agua destilada.

Se empleó la siguiente fórmula para determinar la concentración de albúmina:

$$\text{Albúmina (g/dL)} = \frac{3 \text{ g/dL} \times \text{ABS}_{(MP-BI)}}{\text{ABS}_{(ST-BI)}}$$

3.7.4. Determinación de proteínas totales. Método de Biuret ⁽⁴⁷⁾

Las proteínas totales resultan útiles para realizar el seguimiento de los cambios totales de los niveles de proteínas causados por diversos estados de enfermedad. Generalmente se realiza junto con otras pruebas tales como la seroalbúmina, las pruebas de la función hepática o la electroforesis de proteínas.

Fundamento: Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Reactivo: Complejo EDTA/Cu²⁺ 13 mmol/L en NaOH 875 mmol/L y alquil aril poliéter (AAP).

Protocolo: Se empleó el siguiente protocolo:

En un tubo se agregó 1 mL de reactivo Biuret a 37°C por 5 minutos, luego se agregó 10 µL de suero homogenizándose e incubándose por 15 minutos.

Se preparó un estándar con una solución de proteínas de 8 g/dL y un blanco reactivo (sin suero).

Luego los tubos fueron leídos dentro de los 5 minutos en el espectrofotómetro a 540 nm, llevando a cero con agua destilada.

Se empleó la siguiente fórmula para determinar la concentración de proteínas totales:

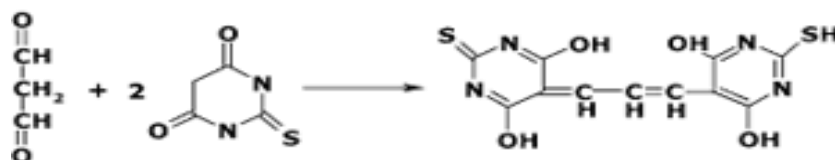
$$[Proteína g/dL] = \frac{[ST]}{ABS_{ST}} \times ABS_{MP}$$

3.7.5. Especie reactivas al ácido tiobarbitúrico. Según el método de Buege J. Aust S. ⁽⁴⁸⁾

Los diferentes aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos presentes en el suero los que son objeto de cuantificación. El malondialdehído es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación.

El malondialdehído, en condiciones acidas y alta temperatura, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a un complejo cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría.

Fundamento: La reacción de dos mol de ácido tiobarbitúrico con una mol de malondialdehído, que es producto de la lipoperoxidación de los ácidos grasos, dando un color rosado con una absorción máxima a los 532 - 535 nm.



Formación del complejo malondialdehído. Analytical Methods for Resolving Data From TBA2-MDA Reaction Mixtures

Para esta técnica se utilizó el sobrenadante del homogenizado de hígado preparado en puntos anteriores o suero y se le agregó TCA al 20% para desproteinizar.

Reactivos:

Ácido tricloroacético 20%

Ácido tiobarbitúrico 0,67% en HCl 0,25N

Protocolo: Se siguió el siguiente protocolo.

Para el suero: Se tomó 0,3 mL de suero y se agregó 0,6 mL de ácido tricloroacético 20%, luego se llevó a baño María hirviendo por 10 minutos,

$$[TBARS \text{ nmol/mL}] = \frac{ABS(MP - Bl) \times V_{Rx} \times 10}{\epsilon \times l \times Vs}$$

concluido el tiempo se enfrió y se agregó el 0,9 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%/HCl 0,25N y se volvió llevar a baño María por 20 minutos. Concluido este tiempo se centrifugó a 4000 nm por 15 minutos y se leyó a 535 nm

Los cálculos de concentración se determinaron mediante la fórmula:

V_{Rx} : volumen de la reacción 1,8 mL

ϵ : Coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Vs : volumen del suero 0,3 mL

l : longitud e la cubeta 1 cm.

Para el tejido hepático: Se tomó 0,3 mL de homogenizado y se agregó 0,6 mL de ácido tricloroacético 20%, luego se llevó a baño María hirviendo por 10 minutos, concluido el tiempo se enfrió y se agregó el 0,9 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%/HCl 0,25N y se volvió llevar a baño María por 20 minutos. Concluido este tiempo se centrifugó a 4000 nm por 15 minutos y se leyó a 535 nm

Los cálculos de concentración se determinaron mediante la fórmula:

$$[TBARS \text{ nmol/mL}] = \frac{ABS(MP - Bl) \times V_{Rx} \times VH \times 10}{\epsilon \times l \times V \times W}$$

V_{Rx} : volumen de la reacción 1,8 mL

ϵ : Coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V : volumen del homogenizado para reacción 0,3 mL

l : longitud e la cubeta 1 cm.

VH : volumen del homogenizado 5 mL

W: peso del tejido para el homogenizado, aproximadamente 0,5 g.

3.7.6. Determinación de bilirrubina, directa indirecta y total según el método de Watson ⁽⁴⁹⁾

Fundamento: La bilirrubina reacciona específicamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se mide fotocolorimétricamente a 530 nm en un ambiente neutral y azul en un medio alcalino.

Si bien la bilirrubina conjugada (directa) reacciona directamente con el diazorreactivo, la bilirrubina no conjugada (indirecta) requiere la presencia de un desarrollador acuoso, benzoato de cafeína que posibilita su reacción. La bilirrubina indirecta se calcula de la diferencia entre bilirrubina total y bilirrubina directa.

Reactivos:

Reactivo A: Solución acuosa de benzoato de cafeína 0,13 mol/L, tamponada y estabilizada.

Reactivo B: Solución de ácido sulfanílico 29 mmol/L y ácido clorhídrico 0,17 mol/L.

Reactivo C: Solución de nitrito de sodio 0,07 mol/L.

Diazorreactivo: Mezcla de 1 parte de Reactivo C con 21 partes de Reactivo B.

Estándar de bilirrubina: 100 mg/L

Protocolo: Se empleó el siguiente protocolo:

Bilirrubina directa: se empleó 200 µL de suero y se agregó 2,5 mL de agua destilada con 200 µL de diazorreactivo, se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó por 5 minutos exactamente, luego fue leído a 530 nm.

Bilirrubina total: se empleó 200 µL de suero con 2,5 mL de reactivo A y 200 µL de diazorreactivo; luego se mezcló e incubó por 5 minutos, luego fue leído a 530 nm.

Estándar de bilirrubina: se empleó 200 µL de una solución de bilirrubina con 2,5 mL de reactivo A y 200 µL de agua, se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó por 5 minutos exactamente, luego fue leído a 530 nm.

Blanco muestra: se empleó 200 µL de suero con 2,5 mL de agua destilada y 200 µL de reactivo B, se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó por 5 minutos exactamente, luego fue leído a 530 nm.

La concentración de bilirrubina directa y total se determinó mediante la siguiente formulas:

$$[\text{Bilirrubina Total mg/L}] = \frac{[ST]}{ABS_{(ST-B)}} \times ABS_{(T-B)}$$

$$[\text{Bilirrubina Directa mg/L}] = \frac{[ST]}{ABS_{(ST-B)}} \times ABS_{(D-B)}$$

$$[\text{Bilirrubina Indirecta}] = \text{Bilirrubina Total} - \text{Bilirrubina Directa}$$

3.8. Diseño estadístico

La muestra fue seleccionada por conveniencia, según el peso corporal de la rata y fue distribuida aleatoriamente en seis grupos de 10 animales cada uno. Luego de la ejecución del diseño experimental los datos fueron ordenados y analizados aplicándose los estadísticos descriptivos como la media o promedio aritmético, la desviación estándar y la variación porcentual. Se le realizó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk, Al tener la muestra una distribución normal se aplicaron las pruebas de análisis de varianza. Los datos se analizaron por grupo, comparándose el grupo control positivo con los grupos tratados referente a todas las variables, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

IV. RESULTADOS

Marcadores enzimáticos: La administración de paracetamol a la dosis de 400 mg/kg (grupo II) produjo un incremento significativo en los marcadores enzimático (ALT y AST), $p < 0,01$. Comparado con el grupo I.

La administración a diferentes dosis de almendra de *Cucurbita maxima* redujo significativamente la actividad de las enzimas ALT y AST, comparado con el grupo II, sin llegar alcanzar los valores del grupo III (silimarina 100 mg/kg + paracetamol).

El tratamiento con paracetamol en el grupo II redujo la relación AST/ALT de 0.67, $p < 0,01$, sin embargo el tratamiento con silimarina y/o almendra de zapallo a las diferentes dosis empleadas incremento esta relación, solo siendo significativo en los grupos III, V y VI.

Tabla N° 01: Actividad sérica de las transaminasas

	ALT U/L	AST U/L	AST/ALT
Grupo I	10,90 \pm 0,77 ^a	9,93 \pm 0,61 ^a	0,92 \pm 0,1 ^a
Grupo II	55,36 \pm 3,38	36,71 \pm 2,60	0,67 \pm 0,07
Grupo III	15,64 \pm 1,38 ^a	12,31 \pm 1,34 ^a	0,80 \pm 0,14 ^b
Grupo IV	20,23 \pm 2,34 ^{ac}	16,40 \pm 6,02 ^a	0,82 \pm 0,32
Grupo V	24,90 \pm 2,55 ^{ac}	22,55 \pm 0,97 ^{ac}	0,91 \pm 0,10 ^a
Grupo VI	23,96 \pm 9,86 ^a	26,64 \pm 7,71 ^{bc}	1,20 \pm 0,47 ^b

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(c) $p < 0,01$ comparado con el grupo III

(d) $p < 0,05$ comparado con el grupo III

Bilirrubina directa, indirecta y total: El tratamiento con paracetamol a la dosis de 400 mg/kg (grupo II) produjo un aumento significativo, $p < 0,01$, de la bilirrubina total y la bilirrubina directa; en el caso de la bilirrubina indirecta no presento diferencia con el grupo I.

La administración de 50 mg/kg de almendra de *Cucurbita maxima* (grupo IV) aumentó los valores de bilirrubina indirecta y bilirrubina total pero redujo el porcentaje de bilirrubina directa, $p < 0,01$.

Tabla N° 02: Niveles séricos de las fracciones de bilirrubina

	Bilirrubina directa	Bilirrubina indirecta	Bilirrubina total	% de bilirrubina directa
	mg/L	mg/L	mg/L	
Grupo I	$0,68 \pm 0,21^a$	$3,40 \pm 0,29$	$4,08 \pm 0,32^a$	$16,60 \pm 4,79^a$
Grupo II	$2,10 \pm 0,35$	$3,01 \pm 0,99$	$5,10 \pm 0,76$	$42,17 \pm 9,36$
Grupo III	$1,25 \pm 0,20^b$	$3,40 \pm 0,25$	$4,65 \pm 0,33$	$26,77 \pm 3,40^a$
Grupo IV	$2,06 \pm 0,26$	$5,26 \pm 1,45^{ac}$	$7,32 \pm 1,46^{bd}$	$29,13 \pm 6,66^a$
Grupo V	$1,46 \pm 0,53^b$	$3,35 \pm 0,47$	$4,81 \pm 0,76$	$29,90 \pm 7,09^b$
Grupo VI	$0,74 \pm 0,34^{ac}$	$2,86 \pm 0,83$	$3,60 \pm 1,11$	$20,13 \pm 4,34^{ac}$

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(c) $p < 0,01$ comparado con el grupo III

(d) $p < 0,05$ comparado con el grupo III

La dosis media de la almendra de *Cucurbita maxima* (300mg/kg + paracetamol) disminuyó los valores de bilirrubina directa y el porcentaje de esta en forma significativa, $p < 0,05$, sin alcanzar los valores del grupo III (silimarina 100 mg/kg + paracetamol); sin embargo al suministrar la alta dosis (800mg/kg + paracetamol) se observó una disminución significativa de estos indicadores alcanzando los valores del grupo III (silimarina + paracetamol).

Proteínas totales y albúmina sérica: La administración de paracetamol a la dosis de 400 mg/kg (grupo II) originó una disminución significativa en los valores de albúmina y proteínas totales, en comparación con el grupo I, sin

embargo en el grupo III (silimarina 100 mg/kg + paracetamol) no se evidencio un aumento significativo de los niveles de albúmina y proteínas totales al compararlo con el grupo II.

La administración de la dosis media y alta de almendra de *Cucurbita maxima* en los grupos V ($p < 0.01$) y VI ($p < 0.05$) aumentaron de forma significativa los niveles de albúmina; observándose un incremento de la concentración de albúmina mayor al del grupo III.

Tabla N° 03: niveles de albúmina y proteínas totales

	Albúmina g/dL	Proteínas totales g/dL	% de albúmina	Albúmina/ globulinas
Grupo I	$3,36 \pm 0,14^a$	$6,09 \pm 0,29^b$	$55,16 \pm 1,72^a$	$1,23 \pm 0,09^a$
Grupo II	$2,82 \pm 0,36$	$5,68 \pm 0,40$	$49,48 \pm 4,32$	$0,99 \pm 0,17$
Grupo III	$2,98 \pm 0,17$	$5,77 \pm 0,19$	$51,62 \pm 1,58$	$1,07 \pm 0,07$
Grupo IV	$2,99 \pm 0,16$	$6,27 \pm 0,31^{ac}$	$47,77 \pm 2,25^c$	$0,92 \pm 0,08^c$
Grupo V	$3,75 \pm 0,42^{ac}$	$7,30 \pm 0,67^{ac}$	$51,67 \pm 6,61$	$1,10 \pm 0,28$
Grupo VI	$3,45 \pm 0,47^b$	$7,25 \pm 1,17^{bd}$	$48,01 \pm 4,49$	$0,93 \pm 0,15$

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(c) $p < 0,01$ comparado con el grupo III

(d) $p < 0,05$ comparado con el grupo III

En relación con los niveles de proteínas totales en los grupos IV, V, VI se observó un aumento significativo, en comparación con el grupo II, estos valores también llegaron a ser mayores al grupo III.

La administración de almendra de *Cucurbita maxima* a la dosis de 300mg/Kg más paracetamol alcanzo niveles significativos en el porcentaje de albúmina y en la relación albumina/globulinas al contrastarlo con el grupo III, $p < 0.01$.

Especie reactiva al ácido tiobarbitúrico: Se observa que la administración de paracetamol (grupo II) produjo un aumento de los índices de lipoperoxidación a nivel del hígado y suero, en comparación con el grupo I ($p < 0,01$).

El grupo III (silimarina + paracetamol) expresó valores bajos de TBARS, comparado con el grupo II, incluso alcanzando los niveles del grupo I.

El tratamiento con la almendra en las tres dosis disminuyó los niveles de TBARS en el tejido hepático, expresando niveles más bajos que el grupo III. Sin embargo a nivel sanguíneo los niveles de TBARS se incrementaron por encima de los valores observados en el grupo II.

Tabla N° 04: Especie reactiva al ácido tiobarbitúrico en hígado y suero

	TBARS hígado	TBARS suero
	$\mu\text{M/g}$	$\mu\text{M/g}$
Grupo I	$14,90 \pm 1,24^a$	$2,90 \pm 0,72^a$
Grupo II	$32,76 \pm 2,80$	$5,65 \pm 1,59$
Grupo III	$14,56 \pm 1,77^a$	$2,54 \pm 0,28^a$
Grupo IV	$5,40 \pm 1,06^{ac}$	$6,78 \pm 0,73$
Grupo V	$7,55 \pm 1,25^{ac}$	$6,85 \pm 1,28$
Grupo VI	$2,66 \pm 0,68^{ac}$	$6,32 \pm 2,30$

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(c) $p < 0,01$ comparado con el grupo III

(d) $p < 0,05$ comparado con el grupo III

Cambios en el tejido hepático: La administración de paracetamol causó aumento no significativo de la masa hepática, comparado con el grupo I, el tratamiento con silimarina + paracetamol, disminuyó el índice hepático, $p < 0,05$.

En el grupo IV se observó una reducción significativa en comparación del grupo II, también hubo una reducción en comparación con el grupo III con un p valor de $p < 0,05$ de los demás grupos se evidencio una leve reducción no significativa del indicador.

Tabal N° 05: índice hepático

	Índice hepático
	%
Grupo I	3,28 ± 0,27
Grupo II	3,50 ± 0,34
Grupo III	3,13 ± 0,17 ^b
Grupo IV	2,86 ± 0,19 ^{ad}
Grupo V	3,25 ± 0,35
Grupo VI	3,22 ± 0,15

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

Histológico

Grupo I: Los cortes histológicos presentaron una estructura conservada de las columnas de hepatocitos, los vasos sanguíneos (venas y arterias) con apariencia normal, canalículos biliares libres y los hepatocitos presentaron una buena delimitación, con algunas células picnóticas.

Grupo II: Algunos cortes presentan alteraciones en las columnas de hepatocitos por edema, con una ligera presencia de células de Kupffer. En una de las láminas se observó un aumento considerable de linfocitos y macrófagos y presencia de células marcadamente picnóticas, también hubo evidencia de reacción fibrótica central.

Grupo III: Se evidenció una buena organización de las columnas de hepatocitos, el espacio de Kiernan se encontró conservado con una alta presencia de células Kupffer. Los hepatocitos y el núcleo con apariencia normal, sin embargo algunas láminas presentan una ligera infiltración linfocitaria. Los vasos normales y el canalículo biliar libre de coacción.

Grupo IV: En las láminas se observó una moderada alteración de la parte terminal de la columna del hepatocito, el espacio de Kiernan estrecho por

congestión debido a edema en los conductos biliares, algunos cortes presentaron arterias engrosadas y venas con congestión, los conductos biliares se mostraron edematosos y obstruidos, también mostraron, en el núcleo de los hepatocitos cariorexis; en algunas de las láminas se observó una discreta infiltración de linfocitos.

Grupo V: Se evidencio una elevada desorganización de la citoarquitectura, confusión de las columnas en la región media, algunas arterias engrosadas con predominancia de congestión venosa, algunos canalículos biliares presentaron edemas y en uno de ellos rodeados por células de Kupffer, se observó en algunos hepatocitos microvascularización y edemas a nivel del núcleo, se evidencio cariólisis y cariorxis, la mayoría de esta células se mostraron picnóticas, con presencia de reunión de polimorfos nucleares.

Grupo VI: Algunos cortes presentaron leves alteraciones, con gran cantidad células de Kupffer, los vasos sanguíneos (arteria y venas) con apariencia normal, canalículos biliares conservados y libres, algunos hepatocito alargados la mayoría con una proporción normal de núcleo y citosol; con presencia escasa cariorexis.

V. DISCUSIÓN

El empleo de plantas medicinales para la prevención y/o tratamiento de enfermedades se ha incrementado en las últimas décadas, esto se debe a que en nuestro medio ha proliferado este rubro comercial, sin ningún respaldo científico sobre sus propiedades. El uso de este recurso es tan antiguo como la civilización, esta información se ha transmitido de generación en generación por vía oral, sin embargo en nuestra cultura, la falta de un lenguaje gráfico ha permitido la pérdida o distorsionado mucha de esta información, es por ello que el presente estudio tiene como finalidad comprobar, con el rigor científico el efecto hepatoprotector de la almendra de semilla de zapallo macre (*Cucurbita maxima*), con la finalidad de garantizar y estandarizar su uso.

El tratamiento con paracetamol a dosis 400 mg/kg indujo a un incremento de las transaminasas (ALT, AST), niveles de bilirrubina directa y total, especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) tanto en suero y tejido hepático y la masa del tejido (expresado en índice hepático) y causó una disminución de los niveles de albúmina y proteína total sérica y de la relación albúmina /globulinas. Estos cambios observados nos indica que el efecto tóxico del paracetamol, en donde un 5% es metabolizado por el citocromo 450 y convertido en NAPQI el cual es rápidamente detoxificado por conjugación del glutatión, disminuyendo el principal antioxidante intracelular, cuando los depósitos de este antioxidante se agotan por sobredosis de paracetamol, el NAPQI se une con las macromoléculas produciendo más radicales libres, reaccionando con la membrana celular induciendo a necrosis intracentrolobulillar ⁽¹⁶⁾.

Los radicales libres generados, no solo quedan en su lugar de origen, sino que circulan por el torrente sanguíneo afectando a otras células de nuestro organismo. La albúmina, capta estos radicales libres y es modificada por oxidación con lo cual conllevaría a un aclaramiento rápido de la circulación y con ello una disminución de sus niveles ⁽⁵⁰⁾.

Las albúminas oxidadas alteran la capacidad de unión de varias sustancias que se utilizan para evaluar la función de albúmina.

Algunos de estos resultados han sido reportados por Arnao y col 2012 en donde tras el tratamiento con paracetamol 250 mg/kg mostró un incremento de los niveles de bilirrubina total, en comparación con el grupo control (sin intervención) ⁽⁵¹⁾, Huamán y col 2013 reportó que el paracetamol a dosis de 400 mg/kg encontró similares resultados respecto a la bilirrubina directa, bilirrubina total, TBARS en hígado y suero ⁽⁵²⁾, en otro estudio realizado por Banely Trinidad 2013 se observó que tras el tratamiento con acetaminofén (paracetamol a dosis única 750 mg/kg) causó un incremento significativo de la actividad del ALT y AST después de 24 horas, respecto al grupo control ⁽⁵³⁾ y en estudio realizado por Kuppan 2011 reportó similares resultados en ratones a dosis de 1 g/kg en donde los niveles de AST, ALT y bilirrubina se incrementaron de forma significativa respecto a control ⁽⁵⁴⁾.

La elevación en suero de estas enzimas es el resultado del vertido a la sangre del contenido enzimático de los hepatocitos afectados debido al aumento de la permeabilidad de la membrana celular de los mismos; como consecuencia de la necrosis celular, siendo por tanto un hecho frecuente que las transaminasas se encuentren elevadas en muchas hepatopatías, pero especialmente en aquellas en las que predomina la existencia de necrosis hepatocitaria; teniendo en cuenta que la ALT es relativamente específica del hígado mientras que la AST, además del hepatocito, se puede encontrar en el músculo cardíaco o esquelético, riñón, cerebro, páncreas y células hematopoyéticas ⁽⁵⁵⁾. Resultados similares a nuestro estudio se han reportado por Daiana Silva Davila y col, el cual indujo al estrés oxidativo, a nivel hepático, con paracetamol a dosis de 200mg/kg y 300mg/kg produciendo la liberación del contenido enzimático a la sangre causado por el daño celular ⁽⁵⁶⁾.

Sin embargo existen estudios en donde se manifiesta que dicho efecto por paracetamol no fueron significativos respecto al control, en los indicadores de peso del hígado, AST, ALT, proteínas totales, albúminas TBARS, empleando dosis de 200 mg/kg ⁽⁵⁷⁾.

A los grupos que se le administraron la suspensión de las almendras de semillas + paracetamol, redujeron los niveles de TBARS a nivel hepático, teniendo valores más bajos que el grupo III (silimarina + paracetamol) y el

grupo I (sin tratamiento) siendo en ambos casos la disminución significativa ($p < 0.01$); sin embargo los niveles de TBARS sérico se elevaron, sobrepasando los niveles del grupo II, siendo este incremento no significativo.

Se puede observar que los tratamientos a diferentes dosis de la suspensión de la almendra de semilla inducen una reducción de los niveles de TBARS a nivel hepático, estos resultados pueden ser atribuidos a los carotenoides y flavonoides presente en la suspensión de la semilla. Esta serie de compuestos bioactivos, de origen vegetal, constituyen un grupo de compuestos que pueden comportarse como antioxidantes, interfiriendo en las reacciones de propagación de los radicales libres y en la formación de los radicales en sí; evitando que metabolitos tóxicos como el NAPQI, producido en la metabolización del paracetamol por acción del PY450 se una a las macromoléculas, como las proteínas, ADN y los ácidos grasos insaturados y generar procesos oxidativos.

En el estudio realizado por Gokhan Eraslan en el 2011 demostró el efecto antioxidante del aceite de semillas de *Cucurbita pepo*, frente a 625 $\mu\text{g/kg}$ dosis de aflatoxinas, donde no solo se evidencio una disminución significativa de los niveles de malondialdehído a nivel hepático, sino también renal, bazo y otros órganos, sugiriendo un efecto antioxidante a nivel sistémico. Los autores consideran que los compuestos implicados en la prevención del daño a la membrana celular, son los fenoles, vitamina E, β -carotenos, fitoesteroles presentes en el aceite de las semillas ⁽⁵⁸⁾, coincidiendo este estudio con el análisis realizado a 4 especies de semillas de cucurbitáceas, en donde se determinó la concentración de fenoles totales, resveratrol y quercetina, en el extracto acuoso de semillas, los cuales mostraron una actividad antioxidante frente a 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) ⁽⁵⁹⁾.

En otro estudio realizado en ratas, se comprobó la actividad antioxidante del aislado de proteína de las semillas de *Cucurbita pepo* frente al efecto toxico del CCl₄ donde se evidencio un aumento de los antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa; junto con una reducción considerable de los valores de malondialdehído a nivel hepático ⁽⁶⁰⁾.

También se reportó la presencia de carotenoides tales como la luteína y la zeaxantina, gran cantidad de α -tocoferol y γ -tocoferol en muestras de aceites de semillas de *Cucurbita Pepo* ⁽⁶¹⁾, hallazgos similares se encontraron en el análisis realizado por David G. Stevenson en el 2007, examinó 12 tipos de aceite de semillas de cucúrbitas entre ellas las de *Cucurbita maxima* encontrando 57,6mg/g de α -tocoferol, 99,3mg/g de γ -tocoferol y 850mg/g de δ -tocoferol ⁽⁶²⁾. Los metabolitos encontrados en las semillas de las cucurbitáceas le han ofreciendo a las almendras de sus semillas propiedades antioxidantes, debido a la alta presencia de estos metabolitos.

En el aceite de semilla de la familia de la *Cucurbita pepo* se han encontrado diferentes tipos de tocoferoles, siendo uno de los más predominantes el γ -tocoferol llegando a concentraciones de 800mg/g; carotenoides como la luteína y β -caroteno; fitoesteroles como el $\Delta 7$ -esterol y $\Delta 5$ -esterol, que son esteroles típicos de la familia de la cucurbitáceas, aparte de otros esteroles, en menor cantidad como el sitosterol y estigmasterol ^{(61) (63)}.

La administración de la suspensión de la semilla *Cucurbita maxima* redujo significativamente los niveles de AST y ALT en comparación con el grupo II, el cual nos indicia que hubo un efecto protector a nivel hepatocelular, sin embargo no logró superar los valores del grupo III;

En cambio la relación AST/ALT aumento de forma significativa en los grupo III, V y VI en comparación del grupo II; esto nos indica que el tratamiento con la suspensión de semillas no solo actúa a nivel hepático sino que también podría ejercer un efecto protector en otros órganos, disminuyendo el daño celular ocasionado por los radicales libres; en un estudio donde se utilizó aflatoxinas administradas per-oral por 21 días para la generación de radicales libres a nivel sistemático; el aceite de semillas de cucúrbita pepo mostro un efecto antioxidante en el cerebro, bazo, corazón, pulmón, riñón e hígado ⁽⁵⁸⁾. El cociente AST/ALT puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial de ciertas enfermedades del hígado, el cociente AST/ALT debe ser siempre interpretado, como cualquier otra prueba bioquímica, con el conocimiento de la historia clínica del paciente ⁽⁵⁵⁾.

El hígado también tiene una función excretora; la excreción de bilirrubina, el cual tiene lugar en las células parenquimatosas hepáticas, la biosíntesis es producto del catabolismo del grupo hem del cual aproximadamente el 75% deriva de la hemoglobina de los hematíes, son segregados a un sistema ramificado de conductos conocido como árbol biliar ⁽⁸⁾.

En el presente estudio la administración de la suspensión de la semilla a 50mg/kg solo redujo el porcentaje de bilirrubina directa de forma significativa, pero aumentó los valores de bilirrubina indirecta y bilirrubina total. Sin embargo la dosis media de *Cucurbita maxima* (300mg/kg + paracetamol) se observó una disminución de la bilirrubina total y las fracciones de esta, sin embargo solo fue significativa en la fracción de bilirrubina directa y el porcentaje de esta (29,9%) y sin llegar alcanzar los niveles del grupo silimarina.

La administración de la dosis más alta de la suspensión de la semilla (800mg/kg) llevó a una disminución en la bilirrubina total y en las fracciones de la bilirrubina, alcanzando los valores del grupo III (silimarina). Estos resultados nos muestran que la suspensión de semilla a la dosis de 800mg/kg tiene un efecto hepatoprotector y que podría ser más eficiente frente al daño producido por el paracetamol que la silimarina.

El hepatocito sintetiza albúmina y globulinas, una de las principales funciones de dicha célula. Las lesiones agudas y difusas del parénquima hepático determinan una disminución de la síntesis de albúmina, la cual es proporcional a la gravedad y extensión de la lesión y sólo empieza a manifestarse ⁽⁸⁾.

En el estudio se demostró que la administración de silimarina no aumentó de forma significativo los valores de albúmina y proteínas totales en comparación con el grupo II, caso contrario, se observó en la administración de las dosis media y alta de la suspensión de semilla de *Cucurbita maxima* (grupos V y VI) aumentaron de forma significativa los niveles de albúmina, siendo estos mayor que los del grupo III

En relación con los niveles de proteínas totales en los grupos IV, V y VI se evidencio un aumento significativo, en comparación con el grupo II; también llegando a ser mayores que el grupo III; caso similar paso con el índice

hepático en el grupo IV que tuvo una reducción significativa ($p<0.01$) en comparación con el grupo II y con el grupo III ($p<0.05$) en los demás grupo tratados con la suspensión de semilla también hubo una reducción leve del índice hepático; por los resultados encontrados en el presente estudio se puede evidenciar que la suspensión de la semilla de cucurbita máxima atenúa la intoxicación por paracetamol a dosis de 400mg/kg.

Este efecto protector sobre la albúmina, proteínas totales e índice hepático puede ser respaldado por los componentes fitoquímicos con capacidad antioxidante y regenerativa que presenta las semillas de *Cucurbita maxima*.

Como reveló el estudio *in vitro* mediante el uso de células mononucleares de sangre periférica se observó que el extracto de semillas de *Cucurbita pepo* a diferentes dosis disminuyó los niveles de los indicadores autoinmunes, mostrando una actividad inmunosupresora, resultados que pueden estar relacionados con los efectos beneficiosos para la salud de extractos de semillas de calabaza ⁽⁶⁴⁾. Estos efectos beneficiosos también se observaron en los resultados de un estudio donde se utilizó aceite de semilla de *Cucurbita maxima* en pacientes, para atenuar los síntomas de trastornos urinarios y de vejiga hiperactiva; encontró en el aceite cantidad de sitosterol, tocoferoles, vitamina D, vitamina E, β -caroteno y ácidos grasos insaturados ⁽⁶⁵⁾.

En el estudio histológico se pudo comprobar que los hígados de las ratas que solo recibieron el tratamiento con paracetamol (grupo II) mostraron mayor daño celular, esto por el aumento de las células de Kupffer, linfocitos; la presencia de fibrosis central y de núcleos con cromatinas condensadas, signos de necrosis; estos resultados concuerdan con los estudios histológicos realizados por Luzmila Troncoso⁽³⁴⁾, Banely Gómez⁽⁵³⁾, Kuppan Nithianantham⁽⁵⁵⁾ que encontraron un aumento de la células de Kupffer, cambios morfológicos de los hepatocitos, mostrando necrosis.

En las ratas que recibieron la suspensión de las almendras de semillas de *Cucurbita maxima* mostraron una leve mejoría tanto en las dosis de baja como en la dosis media, mostrando la arquitectura histológica de secciones de hígado con un grado leve de la degeneración y necrosis; pero donde se

observó una mejoría considerable fue en la dosis alta (800mg/kg) donde hubo disminución de las células de Kupffer sin congestión en los vasos sanguíneos (arterias y venas) y en los canalículos biliares; buena proporción del núcleo y citosol.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

- La administración de la suspensión de la almendra de semilla de zapallo macre (*Cucurbita maxima*), en las dosis de 800mg/kg mostró una protección frente a las lesiones histopatológicas inducidas por paracetamol.
- La administración de la suspensión de la almendra de semilla de zapallo macre (*Cucurbita maxima*), redujo la actividad de los marcadores enzimáticos (ALT, AST), sin llegar alcanzar la efectividad de la silimarina y aumento los niveles de albumina.
- La administración de la suspensión de la almendra de semilla de zapallo macre (*Cucurbita maxima*) redujo los niveles de TBARS en el tejido hepático y los niveles de bilirrubina directa e indirecta en las diferentes en las diferentes dosis llegando a superar a lo observado en la silimarina.
- De lo observado en el presente estudio de investigación, se infiere que la suspensión de la almendra de semilla de zapallo macre (*Cucurbita maxima*) ejerce un efecto hepatoprotector, y esto se evidencia en los indicadores enzimáticos (ALT y AST), albúmina, proteínas totales, TBARS en hígado y bilirrubinas.

6.2. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de capacidad antioxidante in vitro de semilla de Zapallo macre (*Cucurbita maxima*).
- Se recomienda realizar la cuantificación de la actividad enzimática de: SOD, CAT, GPx, GSH y GSSG.
- Estudiar los aspectos técnicos y productivos de la almendra de semilla de Zapallo macre (*Cucurbita maxima*) para su potencial uso terapéutico.
- Elaborar estudios sobre la repercusión del paracetamol en riñón.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bustíos C, Dávalos M, Román, R, Zumaeta E. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. Rev Gastroenterol Perú junio 2004; Vol 27: 238-245.
2. Farfán G, Cabezas C. Mortalidad por enfermedades digestivas y hepatobiliares en el Perú, 1995-2000. Rev. Gastroenterol. Perú, oct./dic. 2002, vol.22, no.4, p.310-323. ISSN 1022-5129.
3. Guyton & Hall; Tratado de fisiología medica; 11ra edición; 2006
4. Linda S. Costanzo, Fisiología, 4ta edición, España 2011.
5. Alan Franciscus y Liz Highleyman, Introducción sobre el Hígado, HOJA INFORMATIVA HCSP, HCSP, VERSIÓN 4 (SP), Noviembre de 2012
6. Francisco Tejada Cifuentes, Hepatotoxicidad por Fármacos, Unidad de Farmacia, Gerencia de Atención Primaria de Albacete, España 2010.
7. Braunwald E, Ghany M, Hoofnagle J, Berk P, Wolkoff A, Dienstag J et al. Harrison. Principios de Medicina Interna. 17ª edición México: Editorial McGraw-Hill Interamericana de México; 2009.
8. Baynes John W, Dominiczak Marek H, Bioquímica médica, 3er edición España: Editorial ELSEVIER España 2011.
9. Graw Allan, Cowan Robert, O'Reilly Denis, Stewart Michael, Shepherd James, Bioquímica clínica, 2da edición, Editorial Harcourt.
10. Vélez Hernán, Rojas William, Borrero Jaime, Restrepo Jorge, Gastroenterología y hepatología, 5ta edición Colombia: Editorial CIB 2005.
11. Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. J Hepatol. 1990; 11:272-6.
12. Zimmerman HJ. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
13. Diana K. Russo, Paracetamol, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano, 2008.

14. Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la Terapéutica, 12da Edición, España 2012.
15. Ignacio A. Sisamón, Acerca de la hepatotoxicidad del paracetamol, Revista del Hospital Privado de Comunidad 2003;vol 6, nº2
16. Mancipe Liliana, Fernández Diana, Fernández Daniel, Intoxicación por acetaminofén, Revista Médica de Colombia 2010, 18(2):221-227.
17. Roldán Tatiana, López Ángelo; Intoxicación por acetaminofén en pediatría aproximación y manejo, Univ. Med. Bogotá (Colombia) 2012, 53(1):56-67
18. Wickens A.P. Ageing and the free radical theory. Respir Physiol 2001; 128:379-91.
19. Justo R. Venereo Gutiérrez, Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes, Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”, Rev Cubana Med Milit 2002;31(2):126-33
20. Marcia Avello, Marío Suwalsky. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular. Universidad de Concepción.
21. J.i. Elejalde Guerra, Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes, (madrid) 2001, Vol. 18, N.º 6, pp. 326-335,
22. Dorado Martinez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S, Estrés oxidativo y neurodegeneración, Rev Fac Med UNAM 2003, 46(6):229-235
23. Núñez Selles A, Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: Retos y oportunidades, revista cubana de salud pública 2011, 37(supl):644-660
24. Vargas Franklin, Rivas Carlos, Nursamaa Abdoel, Zoltan Tamara, Reacciones de radicales libres con la relevancia biológica en la terapia del envejecimiento, Avances de química (Venezuela) 2007, Vol. 2(2):3-15
25. Graham G, Scott K, Day R. Tolerability of paracetamol. Drugs 2003;63 (Special Issue 2):39-42.

26. European Food Information Council, <http://www.eufic.org/article/es/expid/basics-alimentos-funcionales> / Fecha de la última actualización 28/10/2013
27. Comité de Alimentos Funcionales ILSI Argentina, Alimentos funcionales: Desde la Ciencia hacia la definición de un marco regulatorio, 2006
28. The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSE), International Life Sciences Institute (ILSI) Europa 1999
29. Ashwell, M. (2002) Conceptos sobre los alimentos funcionales. En: ILSI EUROPE Concise Monograph Series. (Versión Española, 2004), Bélgica: International Life Sciences Institute. <http://europe.ilsa.org>
30. Fundación española de nutrición (FEN), Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas, Nuevos alimentos. Madrid, Julio del 2005.
31. Bioemprende, Alimentos funcionales: Función Cognitiva y Comportamiento, 2010
32. Selema de la Morena G. y Martínez Pérez J, Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono, Rev Cubana Plant Med 1999;1(4):36-9
33. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G, Sumaya Martínez M, Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo, Investigación y Ciencia de la universidad autónoma de Aguascalientes 2010, 50:10-15
34. Luzmila Troncoso, Emilio Guija, Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol, Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ISSN 1025 – 5583 Págs. 333 – 343, An Fac Med Lima 2007; 68(4)
35. Christiam Ochoa, Cecilia Granda, Martín Chapoñan, Rubén Borja, Paulo Borjas, Jhon Ortiz, Graciela Ugaz, Eberth Puerta, Mario Pucutay; Efecto Protector de *Peumus Boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por

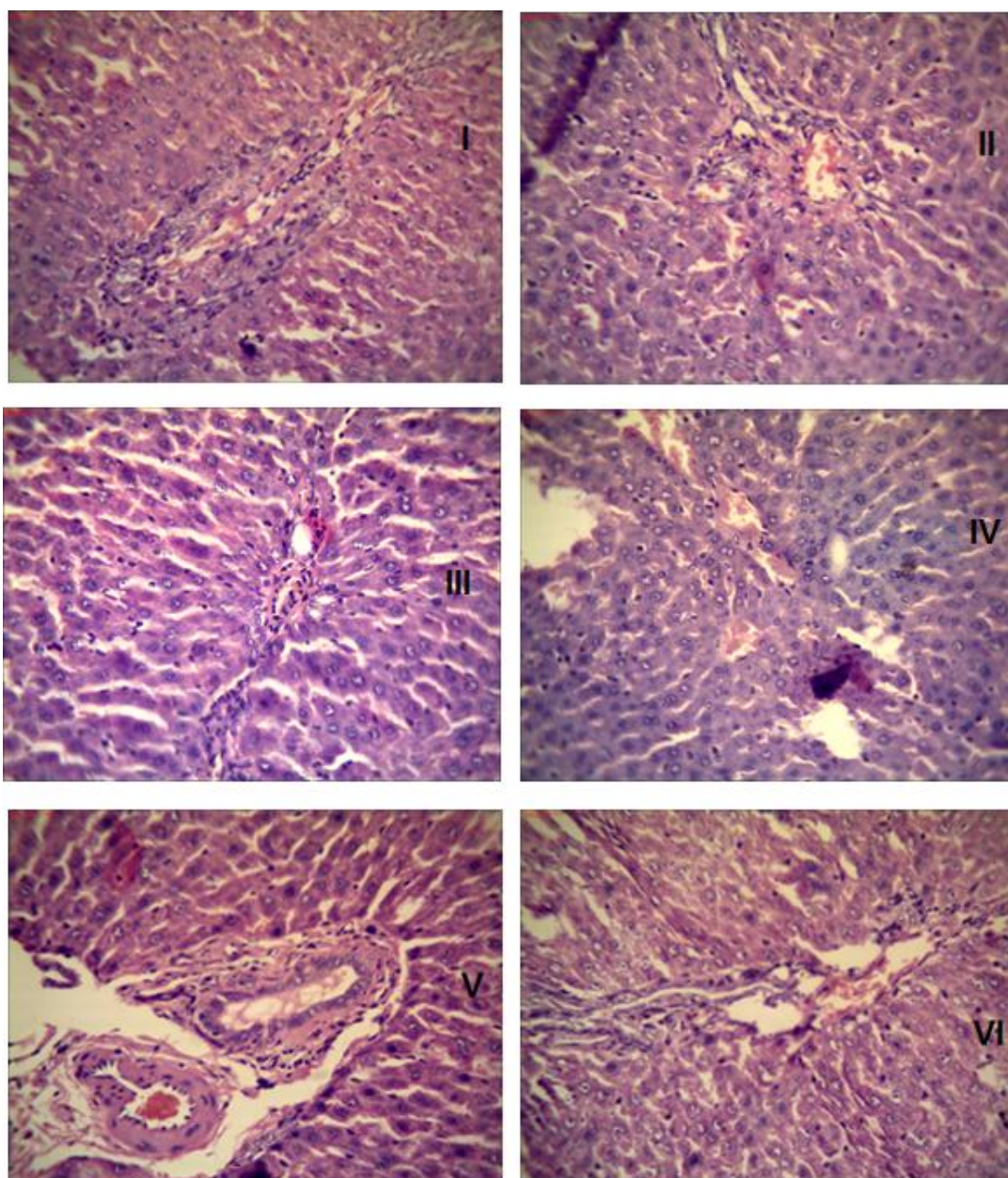
- Paracetamol; Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. CIMEL 2008 Vol.13 N 1
36. Martínez Aguilar, Orlando Martínez Yero, Jesús Córdova López, Manuel Valdivié Navarro Mirna Estarrón Espinosa; Fitoesteroles y escualeno como hipocolesterolémicos en cinco variedades de semillas de *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata* (calabaza); Revista Cubana de Plantas Medicinales 2011;16(1)72-81
37. Sanin Ortiz Grisales; Fruto y semilla de *Cucurbita moschata* fuente de carotenoides y aceite con valor agregado. In: Congreso brasileiro de olericultura, 52. Horticultura Brasileira 30. Salvador; 2012
38. Bloeck Mariano, Valenzuela Gabriela, Cravzov Alicia*, Giménez Cecilia, Gruszycki Mabel; componentes nutricionales de cuatro variedades de semillas de cucurbita spp cultivadas en la región centro-chaqueña, Argentina, Departamento Química Analítica - Universidad Nacional del Chaco Austral; 2012
39. Della Gaspera Pedro, Manual del cultivo de zapallo anquito (*cucúrbita moschata duch.*), Ediciones INTA 2013
40. Whitaker, T. W. y G. N. Davis. 1962. Cucurbits; Botany, Cultivation and utilization. Leonard Hill, New York. 259 p
41. Nayar, N. M. y T. A. More. 1998. Cucurbits. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, EUA.
42. Freeman B, Crapo J, Free radical and tissue injury. Lab invest 1982; 47:412-415.
43. Okuda M, Li K, Beard M, Showalter L, Scholle F, Lenon S, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. Gastroenterol 2002;122(2):366-375.
44. Miñana J, Gómez L, Pallardo F, Del-olmo J, Escuder A. et al. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. Hrepatology. 2002; 35:1205-1214.

45. Gibson JD, Pumford NR, Samokyszyn VM, Hinson JA. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock 72205, USA. Chem Res Toxicol. 1996 Apr-May;9(3):580-5
46. Frankel S. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnostic 7^a Ed. Frakel, Reitman y Sonnenwirth, 1970. P. 123
47. Wiener lab. Group. Vademecum. Reagents for Clinical laboratories. Rosario lab. Group 2000.
48. Buege J. Aust S. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymology 1978; 52; 302-306.
49. Watson D. Analytic methods for bilirubin in blood plasma. Clin Chem. 1961;7/6:603.
50. Karl Oettl, Vanessa Stadlbauer, Franz Petter, Joachim Greilberger, Csilla Putz-Bankuti, Seth Hallström, Carolin Lackner, Rudolf E. Stauber, Oxidative damage of albumin in advanced liver disease, Biochimica et Biophysica Acta 1782 (2008) 469–473
51. Arnao-Salas I, Suárez-Cunza S, Trabucco-Ricaldi J, Cisneros-Chinchay R, Elena-Rodrigo M, Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén, An Fac med. 2012;73(3):239-44
52. Huamán Oscar, Sandoval Miguel, Béjar Elsa, Huamán Zoraida, Tarazona Víctor, Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas, An Fac med. 2013;74(4):279- 83
53. Gómez-Rodríguez Banely T, Cortés Suárez Saúl, Izquierdo-Sánchez Teresa, Efecto del extracto hidroalcohólico de *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre) en modelo de hepatotoxicidad en ratas, Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013;18(3):431-444.

54. Kuppan Nithianantham, Murugesan Shyamala, Yeng Chen, Lachimanan Yoga Latha, Subramanion L. Jothy, Sreenivasan Sasidharan, Hepatoprotective Potential of Clitoria ternatea Leaf Extract Against Paracetamol Induced Damage in Mice, *Molecules* 2011, 16, 10134-10145
55. González Jiménez, Santos Rodríguez, Hipertransaminasemia en Pediatría, *Bol Pediatr* 2013; 53: 137-145
56. Silva Ávilaa D, Schwertner Palmaa A, Dirleise Collea, Rogério Scolaria, Flávia Manarina, Ferreira da Silveirab A, Wayne Nogueiraa Cris, Batista Teixeira Rochaa J, Alexandre F, Antunes Soaresa, Hepatoprotective activity of a vinylic telluride against acute exposure to acetaminophen, *European Journal of Pharmacology* 661 (2011) 92–101
57. Troncoso Luzmila, Guija Emilio, Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol, *An Fac Med Lima* 2007; 68(4)
58. Gökhan Eraslan, Murat Kanbur, Oznur Aslan, Mürsel Karabacak, The Antioxidant Effects of Pumpkin Seed Oil on Subacute Aflatoxin Poisoning in Mice, *Environmental Toxicology*, Volumen 28 , Número 12, páginas 681-688, diciembre 2013
59. Marianna N. Xanthopoulou, Tzortzis Nomikos, Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, Antioxidant and lipoxigenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts, *Food Research International* 42 (2009) 641–646.
60. C. Z. Nkosi, A. R. Opoku, S. E. Terblanche, Antioxidative Effects of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo*) Protein Isolate in CCl₄-Induced Liver Injury in Low-Protein Fed Rats, *Phytother Research*, 20, 935–940 (2006)
61. Giuseppe Procida, Bruno Stancher, Francesca Catenia, Marina Zacchigna, Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volumen 93, Número 5, páginas 1035 a 1041 , 30 de marzo 2013

62. David G. Stevenson, Fred J. Eller, Liping Wang, Jay-Lin Jane, Tong Wang, George E. Inglett, Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars, *Journal of Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4005-4013
63. Gilbert O. Fruhwirth, Albin Hermetter, Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (2007) 1128–1140
64. Christiana Winkler, Barbara Wirleitner, Katharina Schroecksnadel, Harald Schennach, Dietmar Fuchs, Extracts of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seeds Suppress Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro, *American Journal of Immunology*, 1 (1): 6-11, 2005
65. Mie Nishimura, Tatsuya Ohkawara, Hiroji Sato, Hiroshi Takeda, Jun Nishihira, Pumpkin seed oil extracted from *Cucurbita maxima* improves urinary disorder in human overactive bladder, *Journal of Traditional Complementary Medicine*, 2014 Ene-Mar; 4 (1): 72-74.

ANEXOS



(I) Estructura conservada, presencia de 12 células de Kupffer, canaliculo biliar libre, hepatocitos bien delimitados. Buena proporción entre núcleo y citoplasma. (II) Existe cierto desorden periespacial. Canaliculos biliares sinuosos. Insipiente reacción fibrótica central. 20 células de Kupffer. Algunos núcleos marcadamente picnóticos. (III) presenta orden en las columnas de los hepatocitos, aumento de células de Kupffer, canaliculos biliares libres, buena proporción entre núcleo y citoplasma, infiltración linfocitaria en el rango de lo normal. (IV) Fusión de la parte terminal de los hepatocitos. Células de Kupffer escasas. Cariorrexis 40 x campo, discreta filtración de linfocitos. (V) discreta alteración de las columnas de los hepatocitos, engrosamiento de las paredes de las arterias, congestión de las venas, discreto edema de los conductos biliares. En otras láminas presenta cariorrexis. (VI) alteración leve de las columnas de hepatocitos. Vasos y conductos biliares conservados, buena proporción entre núcleo y citosol en buena proporción, algunos núcleos con cariorrexis.